

李玉博, 朱信刚, 杜伟国, 等. 一株猪 A 群轮状病毒的分离及 VP6 多克隆抗体的制备 [J]. 畜牧与兽医, 2026, 58 (7): 56–64.

LI Y B, ZHU X G, DU W G, et al. Isolation and identification of porcine group A rotavirus and preparation of VP6 polyclonal antibody [J]. Animal Husbandry & Veterinary Medicine, 2026, 58 (7): 56–64.

一株猪 A 群轮状病毒的分离及 VP6 多克隆抗体的制备

李玉博^{1,2#}, 朱信刚^{3#}, 杜伟国³, 王紫荷¹, 张萌², 李德昕²,
李向东², 王红岩⁴, 王学杨^{1*}, 张振东^{1,2*}

(1. 江苏科技大学生物技术学院, 江苏 镇江 212018;

2. 扬州大学兽医学院, 江苏 扬州 225009;

3. 禾丰食品股份有限公司, 辽宁 沈阳 110128;

4. 吉林正业生物制品股份有限公司, 吉林 吉林 132101)

摘要: 旨在分离鉴定某猪场猪 A 群轮状病毒 (PoRVA) 的流行毒株及制备 VP6 蛋白的多克隆抗体。选择 PoRVA 呈阳性的腹泻仔猪粪便样品, 处理后接种 Marc145 细胞进行分离培养, 通过 RT-PCR、间接免疫荧光 (IFA) 检测进行鉴定; 扩增 VP6 全长片段, 克隆至原核表达载体 pET-28a, 将测序正确的重组表达质粒转化至大肠杆菌 BL21 (DE3) 感受态细胞, 对表达的重组蛋白进行可溶性分析与镍柱纯化, 通过 SDS-PAGE 和 Western blot 鉴定蛋白的表达与纯化效果; 将纯化后的 VP6 蛋白免疫 BALB/c 小鼠, 收集血清后进行 Western blot 和 IFA 鉴定。结果: 成功分离到 1 株可在体外培养的 PoRVA 毒株 GDYT2024, VP7 基因型为 G12; 诱导表达的重组蛋白主要以包涵体形式存在, 纯化后条带单一 (43 kDa), 与预期结果一致; 间接 ELISA 方法测定制备的鼠源多抗效价均在 1:64 000 以上, Western blot (稀释比 1:500 至 1:3 000) 和 IFA (稀释比 1:500 至 1:1 500) 检测 PoRVA 感染的样品均具有明显的阳性信号, 表明制备的多抗可与病毒蛋白产生良好的免疫反应性。本研究为后续 PoRVA 的分离鉴定及其感染与致病的分子机制研究奠定了基础。

关键词: 猪 A 群轮状病毒; 分离鉴定; VP6; VP7; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: S852.65 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-5130(2026)07-0056-09

Isolation and identification of porcine group A rotavirus and preparation of VP6 polyclonal antibody

LI Yubo^{1,2#}, ZHU Xingang^{3#}, DU Weiguo³, WANG Zihe¹, ZHANG Meng², LI Dexin²,
LI Xiangdong², WANG Hongyan⁴, WANG Xueyang^{1*}, ZHANG Zhendong^{1,2*}

(1. College of Biotechnology, Jiangsu University of Science and Technology, Zhenjiang 212018, China;

2. College of Veterinary Medicine, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China;

3. Wellhope Foods Co., Ltd., Shenyang 110128, China;

4. Jilin Zhengye Biological Products Co., Ltd., Jilin 132101, China)

Abstract: The aim of this study was to isolate and identify the prevalent strains of porcine group A rotavirus (PoRVA) in a pig farm and to prepare polyclonal antibodies for the VP6 protein. The positive fecal samples of PoRVA from diarrheic piglets were collected, selected, processed, and inoculated into Marc145 cells for virus isolation. The strains were identified through RT-PCR and indirect immunofluorescence (IFA) assays. The full-length sequence of VP6 was amplified and cloned into the prokaryotic expression vector pET-28a. The correctly recombinant expression plasmid was transformed into the *Escherichia coli* BL21 (DE3) competent cells. The soluble analysis and nickel column purification of the recombinant protein induced by IPTG were performed, which were identified by SDS-PAGE and Western blot. Finally, BALB/c mice were immunized with the purified VP6 protein, and the serum was collected from the mice for Western blot and IFA identification. The results showed that a PoRVA strain GDYT2024 was successfully isolated, which belonged to G12 genotype (VP7). The recombi-

收稿日期: 2025-06-26; 修回日期: 2026-04-27

基金项目: 扬州大学人才引进科研启动项目

第一作者: 李玉博, 女, 硕士研究生; 朱信刚, 男, 本科。#共同第一作者

*通信作者: 张振东, 副教授, 研究方向为动物分子病毒学与免疫学, E-mail: zhangzhendong90@126.com; 王学杨, 副研究员, 研究方向为家蚕遗传育种学, E-mail: xueyangwang@just.edu.cn。

nant proteins were expressed mainly in the form of inclusion bodies. Purification determined the band to be of 43 kDa, consistent with the expected result. The titer of the prepared polyclonal antibody measured by indirect ELISA was more than 1 : 64 000, and the Western blot (the dilution ratio of polyclonal antibody ranged from 1 : 500 to 1 : 3 000) and IFA (the dilution ratio of polyclonal antibody ranged from 1 : 500 to 1 : 1 500) test results of the samples infected with PoRVA all presented positive signals, indicating that the prepared polyclonal antibody produced a good antigen-antibody reaction with the viral protein. This study laid a foundation for subsequent research on isolation and identification of PoRVA, and on the infection and pathogenic molecular mechanisms of the strain.

Keywords: porcine group A rotavirus; isolation and identification; VP6; VP7; prokaryotic expression; polyclonal antibody

轮状病毒 (rotavirus, RV) 是引起人 (主要为 5 岁以下儿童) 和幼龄动物 (包括猪、牛、马、禽类等) 发生病毒性腹泻的重要人畜共患病原体, 严重危害人类健康和畜牧产业的发展^[1]。猪轮状病毒 (porcine rotavirus, PoRV) 感染主要引起产房仔猪及保育猪的一过性腹泻, 损伤肠道绒毛进而导致猪生长缓慢及料重比升高, 当生产管理不当或与其他病原混合感染时死亡率明显上升^[2-5]。近年来, 猪场 PoRV 检出率不断升高, 加剧了当前猪病的防控难度, 也给公共生物安全带来了极大的风险^[6-8]。PoRV 属于呼肠孤病毒科、轮状病毒属, 其病毒粒子呈二十面体对称结构, 拥有 3 层衣壳 (核衣壳、内衣壳与外衣壳), 无囊膜^[9-10]。PoRV 全长基因组由 11 个分节段的双链 RNA 组成, 分别编码 6 种结构蛋白 (VP1 ~ VP4, VP6, VP7) 与 5 种非结构蛋白 (NSP1 ~ NSP5/6), 其中 VP6 以三聚体形式组成完整病毒粒子的中间层 (内衣壳), 在激活转录酶、促进 mRNA 合成等病毒的复制、装配过程中发挥作用, 也是病毒粒子中含量最丰富的蛋白 (50% ~ 60%), 对维持病毒粒子的稳定性具有重要作用^[11-13]。根据 VP6 序列及抗原性差异, RV 被分为 A~J 共 10 个群, 其中 A、B、C、H、E 群 RV 可感染猪, 而猪 A 群 RV (PoRVA) 在全世界范围内普遍存在, 最为流行^[14-15]。本研究旨在从一腹泻猪场的粪便样品中分离 PoRV, 对分离毒株的 VP6 和 VP7 进行测序和遗传进化分析, 以了解该场 PoRV 的流行情况; 同时表达纯化 VP6 蛋白免疫 BALB/c 小鼠制备多克隆抗体, 以期为后续进一步研究 VP6 蛋白的生物学功能及病毒感染与致病的分子机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 病料来源

采集广州市某猪场 PoRVA 阳性粪便样品, 与 PBS 按 1 : 3 进行均质化, -80 ℃ 反复冻融 3 次, 4 ℃ 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液用 0.22 μm 滤器过滤, 于 -80 ℃ 冻存。

1.2 主要材料

胎牛血清购自上海双洙生物科技有限公司; 胰蛋

白酶-EDTA 消化液 (0.25%) 含酚红、青链霉素混合液 (100×) 购自北京索莱宝科技有限公司; 胰蛋白酶 1 : 250 购自兰杰柯科技有限公司 (Biosharp); DMEM 培养基购自格来赛生命科技 (上海) 有限公司; pET-28a 表达载体、大肠杆菌 BL21 宿主菌、Marc145 细胞为本实验室保存; Simply P 病毒 DNA/RNA 提取试剂盒购自杭州博日科技股份有限公司; HiScript III 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)、2 × Taq Plus Master Mix II、DL2000 DNA Marker 购自南京诺唯赞生物科技股份有限公司; 胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒购自康为世纪生物科技股份有限公司; BamH I、Xho I 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司; Bradford 蛋白浓度测定试剂盒、His 标签纯化树脂购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 鼠抗 His 标签抗体、辣根过氧化物酶 (HRP) 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体、山羊抗兔 IgG 抗体购自爱博泰克公司; Alexa Fluor 488 偶联抗兔 IgG 抗体购自 Cell Signaling Technology 公司; 弗氏完全佐剂、弗氏不完全佐剂购自 Sigma-Aldrich 公司; ECL 超敏型发光液购自亚科因 (武汉) 生物技术有限公司; 毒株 RVA/Pig/China/AHBZ2303/2023/G11P [7] (AHBZ2303)、RVA/Pig/China/AHBZ2304/2023/G9P [23] (AHBZ2304)、RVA/Pig/China/AHBZ2305/2023/G9P [23] (AHBZ2305)、RVA/Pig/China/AHBZ2310/2023/G9P [23] (AHBZ2310) 由本实验室分离保存; SPF 级 BALB/c 小鼠购自扬州大学实验动物中心; PoRVA VP6 兔源多克隆抗体由广西大学制备与馈赠^[16]。

1.3 引物设计

通过对比 NCBI 中多株 PoRVA VP6、VP7 序列, 使用 SnapGene 软件设计 VP6、VP7 通用引物; 以当前分离毒株的 VP6 序列, 利用 SnapGene 软件分析后, 上下游引物 5'端分别引入 BamH I 和 Xho I 酶切位点交由生工生物工程 (上海) 股份有限公司进行合成, 引物相关信息见表 1。

表 1 PCR 引物相关信息

引物名称	引物序列 (5'→3')	产物长度/bp
VP6-F	GGCTTTWAAACGAAGTCTTC	1 209
VP6-R	GGTCACATCCTCTCACT	
VP7-F	GGCTTTAAAAGAGAGAATTTCCG	1 060
VP7-R	GGTCACATCATACARTTCTAA	
VP6-28a-BamH I -F	CGCGGATCCATGGAGGTTCTGTACTCACTG	1 194
VP6-28a-Xho I -R	CCGCTCGAGCTTAATCAGCATGCTTCTAATAG	

注：下划线为酶切位点。

1.4 病毒分离和传代

将 1.1 中的上清液与 10 μg/mL 的胰酶混合，于 37 ℃ 中孵育 2 h，将其接种于单层 Marc145 细胞上，于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱感作 1.5 h 后弃掉病毒液，PBS 洗 2 次，补加维持液（含 4 μg/mL 胰酶的 DMEM）于 37 ℃、5% CO₂ 培养箱中培养。按上述方法盲传 3 代，未见明显致细胞病变效应（CPE）的培养物于 3 d 后收毒，CPE 达 80% 以上收毒，反复冻融 3 次于 -80 ℃ 冻存。

1.5 间接免疫荧光（IFA）检测

按照 1.4 操作对第 3、4 代病毒液进行预处理后感染单层 Marc145 细胞，同时设立未感染病毒的细胞作为空白对照。以 VP6 兔源多克隆抗体（1：1 500 倍稀释）为一抗，在感染后 48 h 进行 IFA 检测。

1.6 病毒 VP6 和 VP7 扩增和序列分析

提取 1.4 中收集的第 3 代病毒样品的 RNA，具体操作参照核酸提取试剂盒说明书。以提取的 RNA 为模板反转录合成 cDNA，以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，进行琼脂糖凝胶电泳测定。将阳性样品送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

1.7 VP6 的 PCR 扩增及原核表达载体构建

以本研究分离毒株的 RNA 为模板，反转录合成 cDNA，以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。将胶回收的 PCR 产物与 pET-28a 空载经 BamH I 和 Xho I 双酶切后，使用 T4 DNA 连接酶进行 16 ℃ 过夜连接。将连接产物转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞，挑取单菌落培养 4~6 h，PCR 鉴定正确后，将阳性菌液送至生工生物工程（上海）股份有限公司进行测序。

1.8 VP6 蛋白的原核表达及可溶性分析

将测序正确的阳性菌液接种于 5 mL 含卡那霉素抗性的 LB 液体培养基，37 ℃ 条件下 200 r/min 过夜培养。将扩大培养的菌液以 1：20 的比例转接于含卡那霉素的 LB 液体培养基，同时设置无目的片段的空载作为对照组，37 ℃ 培养至对数期，试验组分别给予 0.25、0.5、0.75 和 1 mmol/L 的 IPTG，在 37 ℃

诱导温度下 180 r/min 诱导表达 4 h，经 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色确定最佳诱导浓度。将诱导温度设置为 16 ℃、25 ℃ 和 37 ℃，180 r/min 分别诱导 16、12 和 4 h，收集菌体，加入裂解液，重悬后进行超声破碎，离心后分别取上清液和沉淀进行 SDS-PAGE 和考马斯亮蓝染色，分析目的蛋白的表达形式。

1.9 VP6 重组蛋白的纯化与鉴定

在最佳诱导浓度与最佳诱导温度下大量诱导培养阳性菌液，收集菌体，加入裂解液，重悬后进行超声破碎，破碎后的样品进行蛋白纯化，具体方法参照 His 标签纯化树脂说明书。纯化后的目的蛋白采用浓缩柱进行脱盐复性处理后，用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒测定目的蛋白浓度。最后采用 SDS-PAGE 及考马斯亮蓝染色对纯化后的目的蛋白进行鉴定。同时对制备蛋白样品进行 Western blot 鉴定，以鼠抗 His 标签抗体（1：10 000 倍稀释）为一抗，4 ℃ 过夜孵育；洗膜，以 HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体（1：10 000 倍稀释）为二抗，于室温下孵育 2 h；洗膜，加入 ECL 超敏型发光液显色，使用 Tanon 发光成像系统进行观察。

1.10 VP6 多克隆抗体的制备及抗体效价测定

首免前采集小鼠血清作为阴性对照。首免按照 50 μg/只的剂量，将纯化后的蛋白与等体积的弗氏完全佐剂充分混合乳化后，采用背部皮下多点注射法对所选的 6 只 8 周龄的 BALB/c 小鼠进行免疫；VP6 重组蛋白与等体积的弗氏不完全佐剂混合乳化作为免疫原，以同样的方法对免疫后的动物进行二免和三免。首免、二免、三免间隔 2 周。三免结束 2 周后，采集被免疫小鼠的血液收集阳性血清，分装保存。以纯化的 VP6 重组蛋白为抗原包被酶标板，以采集的多克隆抗体阳性血清为一抗，HRP 标记的山羊抗鼠 IgG 抗体为二抗，利用间接 ELISA 方法进行血清效价测定，用酶标仪测定 $D_{450\text{ nm}}$ 值。

1.11 Western blot 和 IFA 检测

将 AHBZ2303、AHBZ2304、AHBZ2305 和 AHBZ2310 株按照感染比（MOI）= 0.01 的剂量感染 Marc145 细

胞，48 h 后收取蛋白样品，使用本研究制备的 VP6 鼠源抗多克隆抗体，按照 1：500、1：1 000、1：2 000、1：3 000 的比例稀释进行 Western blot 检测。同时以 Marc145 细胞蛋白样品及本实验室保存的猪流行性腹泻病毒（PEDV）LZW 株、猪德尔塔冠状病毒（PDCoV）CHN-HN-1601 株、猪繁殖与呼吸综合征病毒（PRRSV）JSsz2020 株感染的 Marc145 细胞蛋白样品为对照，按照 1：500 的比例稀释 VP6 鼠源多克隆抗体进行 Western blot 检测。将 AHBZ2303 株、AHBZ2304 株和本试验分离株按照 MOI=0.01 的剂量感染 Marc145 细胞，同时设立未感染病毒的细胞为空白对照，在感染后 48 h，按照 1：500、1：1 000、1：1 500 的比例稀释 VP6 鼠源多克隆抗体作为一抗，

同时 VP6 兔源多克隆抗体按照 1：1 500 的比例稀释作为阳性对照，进行 IFA 检测。

2 结果

2.1 病毒分离与传代培养鉴定

将 PoRVA 阳性样品处理液接种于单层 Marc145 细胞，接种 72 h 后，显微观察无明显细胞病变；按照相同方法盲传至第 3 代，显微镜下可见细胞融合、皱缩与崩解等典型的细胞病变。使用 PoRVA VP6 兔源多克隆抗体进行 IFA 鉴定，病毒感染组可见特异性绿色荧光信号，未感染组无阳性信号（图 1）。以上结果表明成功分离到 1 株 PoRVA，将其命名为 GDYT2024。

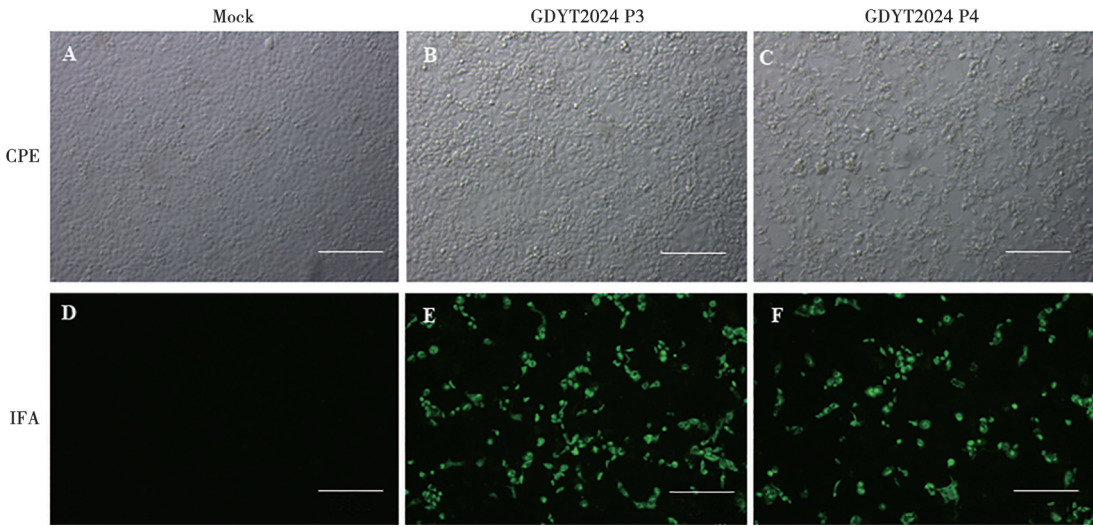
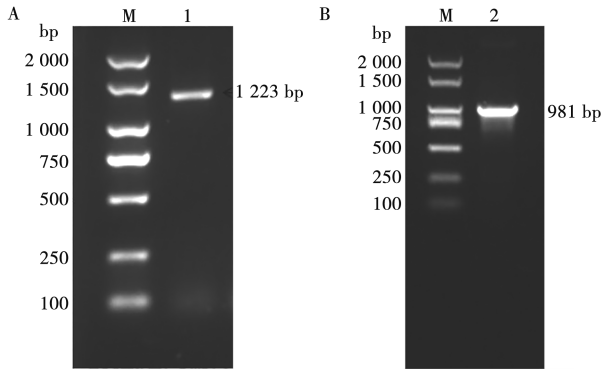


图 1 GDYT2024 感染 Marc145 细胞的 CPE 及 IFA 结果（比例尺=100 μm）

2.2 分离株 VP6、VP7 扩增及核酸序列分析

使用表 1 中设计的 VP6、VP7 引物进行 PCR 扩增，可以得到与预期一致的条带，测序后分别获得 1 223 bp 及 981 bp 的全长序列（图 2A、B），将 GDYT2024 的 VP6、VP7 序列上传 NCBI，获得序列号 PV262250 与 PV262251。将 VP6、VP7 进行 BLAST 分析，发现其与 MH021179 及 OR948030 同源性最高，分别为 97.69% 和 97.55%。选取已上传的 10 株 A 群 PoRV VP6 参考序列与 2 株 G9 型和 8 株 G12 型 VP7 参考序列，使用 MEGA 11.0 软件分别绘制 VP6、VP7 的遗传进化树。结果显示，GDYT2024 株与 FX17（OM362095）亲缘关系最近（图 3A），其基因型为 I5 型；GDYT2024 处于 G12 型分支，与 GZYP2209224 株（OR948031）、GZYP2209223 株

（OR948030）亲缘关系最近（图 3B）。



M. DL2000 DNA Marker; 1. VP6; 2. VP7。

图 2 GDYT2024 毒株 VP6（A）、VP7（B）PCR 扩增结果

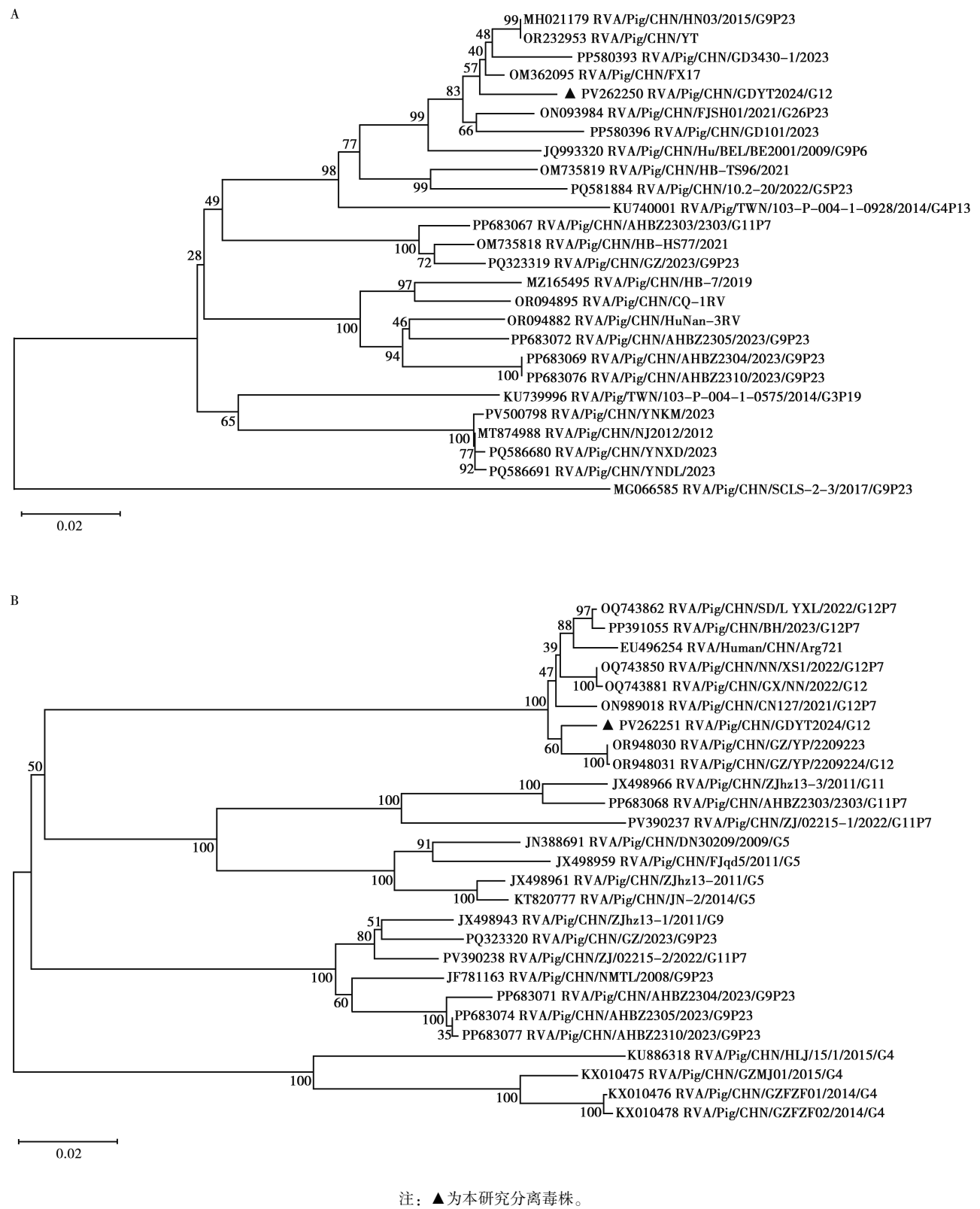


图3 VP6 (A)、VP7 (B) 基因遗传进化树分析

2.3 VP6 PCR 扩增与重组表达载体的构建

PoRV VP6 的 PCR 扩增产物电泳后可见 1 条约 1 194 bp 的条带，与预期片段大小相符合（图 4）。双酶切后，将目的片段与表达载体 pET-28a 连接，

并转化至大肠杆菌 BL21 感受态细胞，挑取单菌落培养，PCR 鉴定阳性菌液送至生物公司进行测序。测序正确表明重组表达载体构建成功，将重组质粒命名为 pET-28a-VP6。

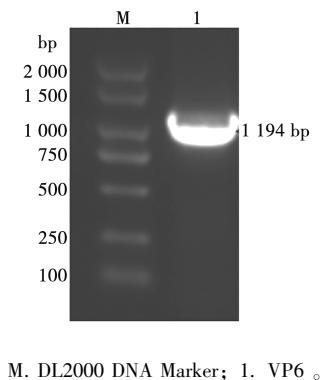


图 4 VP6 PCR 扩增结果

2.4 重组质粒的表达

将鉴定正确的 pET-28a-VP6 阳性菌液扩大培养，同时设立无目的片段的空载为对照，探索最佳的 IPTG 诱导浓度。结果显示，对照组未见目的蛋白条带，试验组在 43 kDa 可见目的蛋白条带，但随 IPTG 浓度的升高，目的蛋白条带含量未见明显变化，表明 IPTG 浓度的变化对目的蛋白的表达无太大影响（图 5A）。选择 IPTG 终浓度为 0.5 mmol/L 进行诱导温度的探索及目的蛋白的可溶性分析，结果显示，在 25 ℃ 诱导处理样品的沉淀中，目的蛋白的表达量最大，且为不可溶性表达（图 5B）。纯化后蛋白条带单一（图 5C），质量浓度为 0.744 mg/mL。

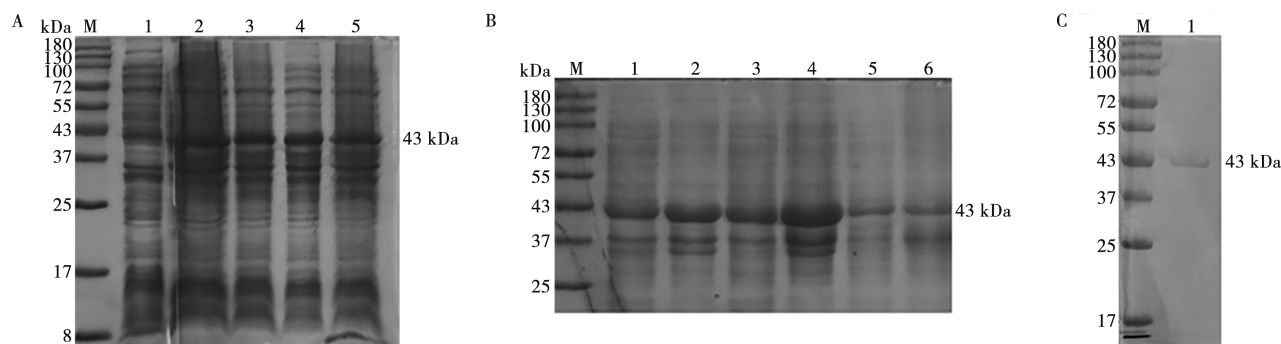


图 5 重组表达载体表达条件的优化

2.5 多克隆抗体效价的测定

利用间接 ELISA 方法测定抗体的效价，当阳性血清孔与阴性血清孔 $D_{450\text{ nm}}$ 值的比值 (P/N) > 2.1 时，最高稀释度为该多克隆抗体的效价。纯化后鼠抗 PoRV VP6 蛋白多克隆抗体 3 次检测效价均在 1 : 64 000 以上（图 6）。

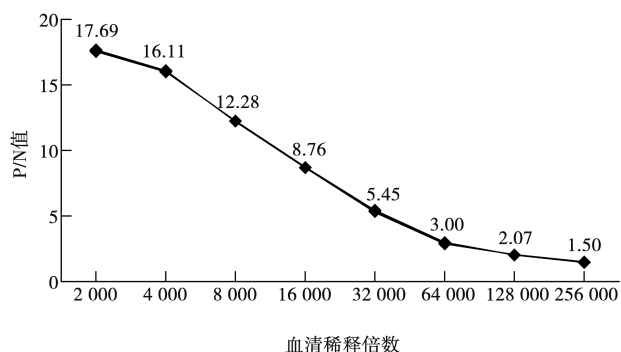


图 6 VP6 多克隆抗体效价检测

2.6 多克隆抗体的 Western blot 和 IFA 验证

PoRVA AHBZ2303、AHBZ2304、AHBZ2305、AHBZ2310 株感染 Marc145 细胞后的蛋白样品经 SDS-PAGE 后，转移到 PVDF 膜上进行 Western blot 检测，结果显示，制备的 VP6 多抗在 1 : 500 至 1 : 3 000 倍稀释下与蛋白样品反应的 PVDF 膜上出现 43 kDa 条带，与预期大小相符（图 7A~D），且不与 Marc145 细胞蛋白样品及 PEDV、PDCoV、PRRSV 等病毒感染细胞的蛋白样品产生特异性抗原抗体反应（图 7E），表明制备的多克隆抗体能够特异性地识别 PoRVA 并具备良好的反应原性。

IFA 结果显示，用 VP6 鼠源多抗血清检测 AHBZ2303、AHBZ2304、GDYT2024 株感染的 Marc145 细胞可见有特异性的绿色荧光信号，而空白对照组细胞则无绿色荧光信号，表明制备的 VP6 鼠源多抗血清能够用于 PoRVA 的 IFA 特异性检测，且与 VP6 兔源多克隆抗体检测结果无显著性差异（图 8）。

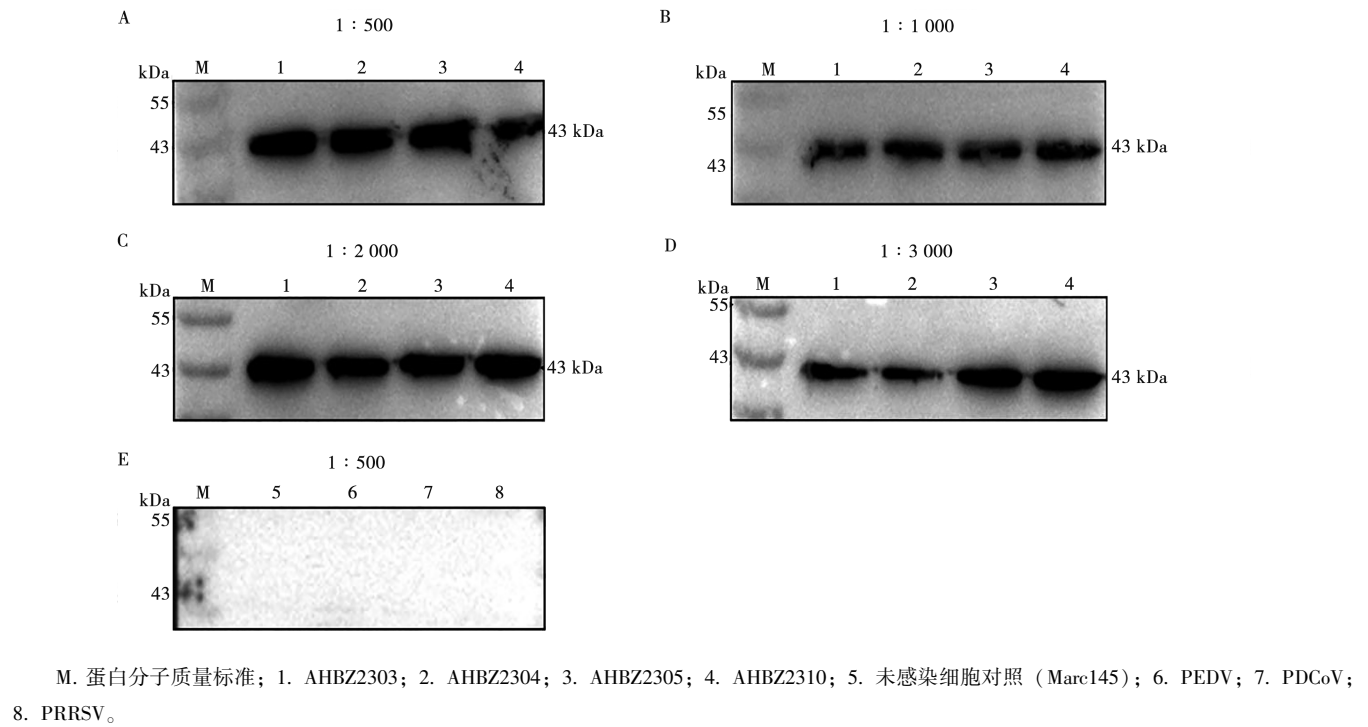


图 7 VP6 多克隆抗体的 Western blot 鉴定

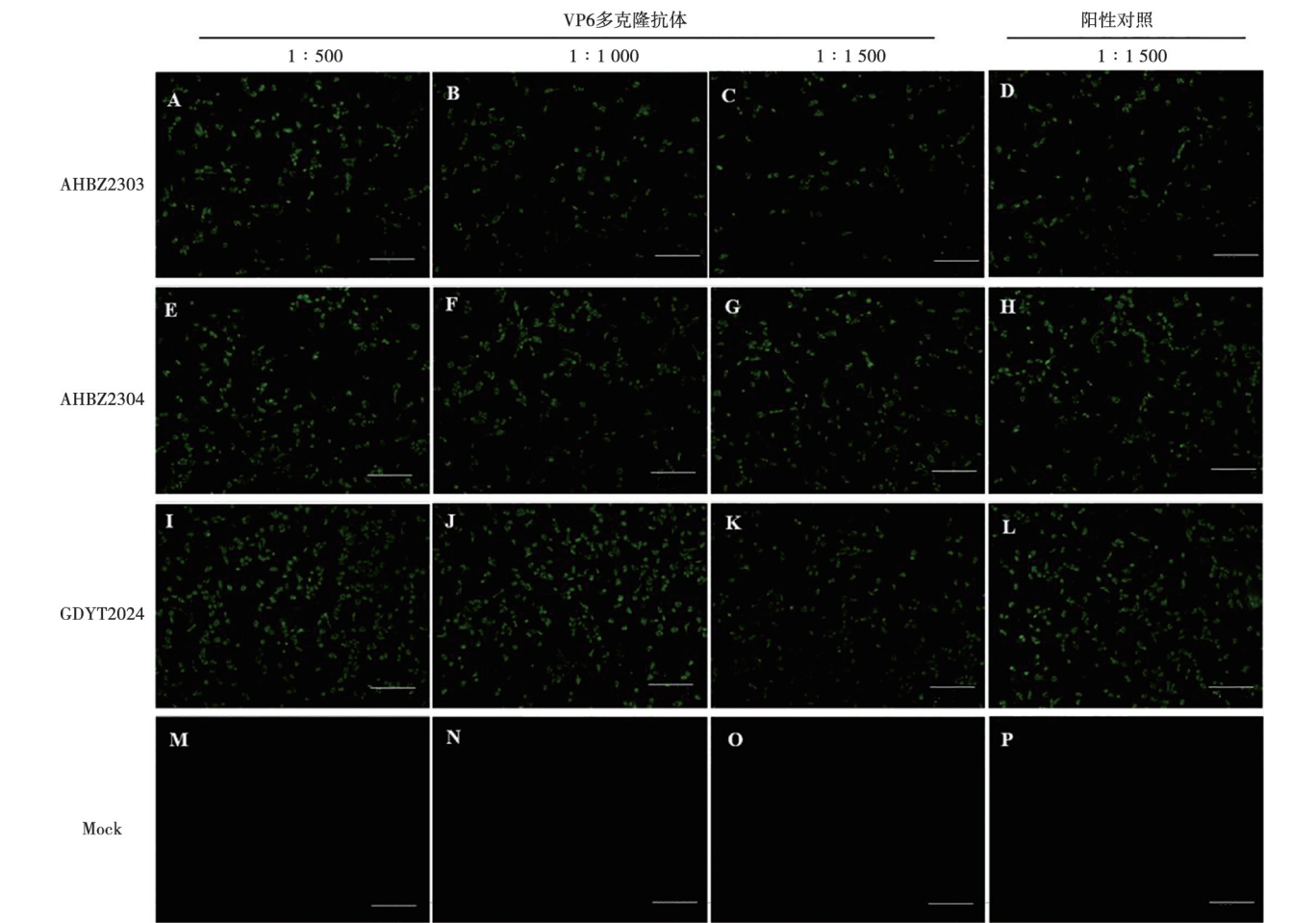


图 8 VP6 多克隆抗体 IFA 鉴定 (比例尺=100 μm)

3 讨论

PoRV 在全球范围内广泛流行,可感染所有年龄段的猪,尤其是仔猪,引起腹泻、呕吐和脱水等临床症状,且常与其他肠道病原体混合感染使症状加重,严重损害猪群肠道健康进而影响猪的生长。PoRV 最早由 Bohl^[17]用 MA104 细胞在体外成功分离;时洪艳等^[18]使用 20 $\mu\text{g/mL}$ 胰酶处理病料,从 MA104 细胞上分离到 PoRV;王振玲等^[19]使用 30 $\mu\text{g/mL}$ 胰酶处理病料,在 Marc145 细胞上成功分离 PoRV,同时杨文字等^[20]也使用 Marc145 细胞分离到 PoRV。本研究基于上述 PoRV 分离方法,将样品研磨过滤液与 10 $\mu\text{g/mL}$ 胰酶于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 2 h 预处理后接种于单层 Marc145 细胞,进行病毒分离培养。在盲传第 3 代开始出现 CPE,传至 4 代后分离株可以在 Marc145 细胞上产生稳定的 CPE,细胞变圆肿胀、边界模糊、脱落、颗粒增多,呈葡萄串状堆积,出现胞浆相连融合灶及拉网现象,细胞单层脱落,该结果与黄小波等^[21]研究结果相似。近年来,我国猪场 PoRV 的检出率及流行率逐渐升高,据 Qiao 等^[22]对我国 23 个省 230 个猪场收集的 25 768 份哺乳仔猪腹泻样品的最新调查发现,PoRV 样品阳性率为 51.15%,猪场 PoRV 阳性率高达 86.52%;进一步的遗传进化分析表明,G9、P [13] 和 I5 是主要的基因型,G9P [23] 为最常见的基因型组合。G12 型 PoRV 于 2002 年首次在印度东部由 Ghosh 等^[23]发现;Miao 等^[24]在 2022 年分离到 1 株人猪重组 PoRV (CN127),其基因型为 G12P [7];本研究成功分离到 1 株稳定传代的 G12 型 PoRV,但并未进行全基因组分析,其是否存在与其他物种的重排或重组现象值得后续研究。此外,临床上需加强对该基因型 PoRV 的检测,提前防范以规避其潜在的公共卫生风险。同时本研究尝试使用了多对 VP4 引物进行 PCR 扩增,均未得到目的条带,这可能与该毒株 VP4 变异较大、使用引物与本研究分离毒株不匹配等有关,后续可采用高通量测序方法对 GDYT2024 进行全基因组测序。

抗体是研究病毒感染及其致病机制、与宿主相互作用及相关蛋白质功能等不可或缺的工具。李素芬等^[25]以 JSNJ2019 全病毒为免疫原制备了兔源多克隆抗体;王奕斐等^[16]选取了 VP4 开放阅读框的 2 个区域及 VP6 的完整开放阅读框制备了相应的兔源多克隆抗体;而李科茫等^[5]制备了 PoRVA 鼠源 VP6 的单克隆抗体,为相关基础研究及临床血清学检测方法的开发奠定了基础。相比于单克隆抗体,多克隆抗体的制备具有简单、经济、包容性强、稳定性高等优势。为后续进一步开展 VP6 蛋白的生物学功能及 PoRV 的

基础性研究,本研究成功构建了 PoRVA 重组表达载体 pET-28a-VP6,参照王奕斐等^[16]的试验,对 IPTG 的诱导浓度、温度及时间进行了优化,最终选择了 0.5 mmol/L 作为诱导浓度、25 $^{\circ}\text{C}$ 诱导 12 h 作为时间条件,获得了纯化的 PoRVA VP6 重组蛋白及其鼠源多克隆抗体。Choi 等^[26]发现,通过密码子优化可以显著提高人源 RV VP6 重组蛋白在大肠杆菌中的表达。本研究直接扩增了 PoRVA VP6 的全长核苷酸,未对密码子进行优化,重组蛋白浓度达 0.744 mg/mL,其产量可满足鼠源多抗制备的需求。本研究制备的 VP6 鼠源多克隆抗体在 Western blot (1 : 3 000 稀释) 和 IFA (1 : 1 500 稀释) 试验中均表现出良好的反应原性。

综上,本研究成功分离到了 1 株 G12 型 PoRVA,制备的抗体可用于后续 VP6 蛋白功能研究及 PoRVA 感染诊断方法的建立。

参考文献:

- [1] 张振东,吴承月,陈月,等.我国猪轮状病毒的流行与展望[J].畜牧与兽医,2024,56(12):131-138.
- [2] ZHANG Z, LI D, HE S, et al. High pathogenicity of emerging porcine G9P [23] and G11P [7] rotavirus for newborn piglets in China [J]. Front Vet Sci, 2025, 12: 1531861.
- [3] ZHANG Z, WU C, CHEN Y, et al. Isolation, genomic characterization and evolution of six porcine rotavirus a strains in a pig farming group [J]. Vet Sci, 2024, 11 (9): 436.
- [4] 于洪敏,单春乔,梁方印,等.猪轮状病毒抗原蛋白相关特性的研究进展[J].中国兽医杂志,2023,59(12):99-103.
- [5] 李科茫,周金柱,周俊明,等.猪 A 群轮状病毒 VP6 单克隆抗体的制备和初步鉴定[J].畜牧与兽医,2023,55(4):79-85.
- [6] 林正丹.猪轮状病毒 TaqMan 荧光定量 RT-PCR 方法的建立及病毒分离鉴定[D].武汉:华中农业大学,2023.
- [7] 李颖. *Lactobacillus paracasei* 6105 通过促进 Pbld1 高表达修复猪轮状病毒损伤的 IEC-6 细胞 [D]. 大庆:黑龙江八一农垦大学,2023.
- [8] 米文琴.表达猪轮状病毒 VP6 蛋白重组枯草芽孢杆菌的免疫效果评价[D].武汉:华中农业大学,2023.
- [9] MARTELLA V, BÁNYAI K, MATTHIJNSSENS J, et al. Zoonotic aspects of rotaviruses [J]. Vet Microbiol, 2010, 140 (3/4): 246-255.
- [10] 黄校花.抗猪轮状病毒 VP6 单克隆抗体的制备及双抗体夹心 ELISA 检测方法的建立[D].南昌:江西农业大学,2023.
- [11] SHEPHERD F K., FREEMAN M J, CULHANE R M, et al. Reoviruses (rotaviruses and reoviruses) [M] // Zimmerman J J, Karriker L A, Ramirez A, et al. Diseases of Swine. Hooboken, New Jersey: Jolin Wiley & Sons, Inc., 2019: 715-727.
- [12] 任晓峰,窦秀静,郝雅环,等.猪轮状病毒 DN30209 株 VP4 全长蛋白表达及多抗制备和鉴定[J].东北农业大学学报,2014,45(12):10-17.

- [13] 张婧旭. 猪轮状病毒 GZAS2020 株的分离鉴定及其基因组差异性分析 [D]. 贵阳: 贵州大学, 2023.
- [14] 曲雅新. 猪轮状病毒、札幌病毒和星状病毒三重 PCR 检测方法的建立和猪小肠上皮细胞的初步分离 [D]. 南宁: 广西大学, 2020.
- [15] 崔蕾. 猪轮状病毒抗体间接 ELISA 与分型 qRT-PCR 检测方法的建立 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2023.
- [16] 王奕斐, 洪大林, 米雪, 等. 猪轮状病毒 VP4、VP6 蛋白原核表达及多克隆抗体的制备 [J]. 中国兽医学报, 2022, 42 (11): 2171-2180.
- [17] BOHL E H, THEIL K W, SAIF L J. Isolation and serotyping of porcine rotaviruses and antigenic comparison with other rotaviruses [J]. J Clin Microbiol, 1984, 19 (2): 105-111.
- [18] 时洪艳, 陈建飞, 王承宝, 等. 猪轮状病毒 Rotavirus A pig/China/NMTL/2009/G9P [23] 株的分离与鉴定 [J]. 中国预防兽医学报, 2011, 33 (9): 681-684.
- [19] 王振玲, 章丽娇, 段跃强, 等. 猪轮状病毒的分离与电镜观察 [J]. 畜牧与兽医, 2014, 46 (1): 77-80.
- [20] 杨文宇, 朱玲, 周远成, 等. 猪轮状病毒四川株的分离鉴定及增殖规律 [J]. 中国兽医学报, 2014, 34 (2): 192-198.
- [21] 黄小波, 徐璐, 曹三杰, 等. 猪轮状病毒 OSU 株的培养特性与致病性研究 [J]. 中国人兽共患病学报, 2012, 28 (2): 120-123, 147.
- [22] QIAO M, LI M, LI Y, et al. Recent molecular characterization of porcine rotaviruses detected in China and their phylogenetic relationships with human rotaviruses [J]. Viruses, 2024, 16 (3): 453.
- [23] GHOSH S, KOBAYASHI N, NAGASHIMA S, et al. Full genomic analysis and possible origin of a porcine G12 rotavirus strain RU172 [J]. Virus Genes, 2010, 40 (3): 382-388.
- [24] MIAO Q, PAN Y, GONG L, et al. Full genome characterization of a human-porcine reassortment G12P [7] rotavirus and its pathogenicity in piglets [J]. Transbound Emerg Dis, 2022, 69 (6): 3506-3517.
- [25] 李素芬, 汤学超, 周金柱, 等. 猪轮状病毒 G1P [7] 株分离鉴定及多克隆抗体制备 [J]. 畜牧与兽医, 2024, 56 (4): 101-107.
- [26] CHOI A H, BASU M, MCNEAL M M, et al. Intranasal administration of an *Escherichia coli*-expressed codon-optimized rotavirus VP6 protein induces protection in mice [J]. Protein Expr Purif, 2004, 38 (2): 205-216.